

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/10, C07D 207/42, 207/34, B01D 15/08, C07H 21/00, 1/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/41367 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1999 (19.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00580 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Januar 1999 (29.01.99) (30) Prioritätsdaten: 198 05 431.9 11. Februar 1998 (11.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUCHHOLZ, Herwig [DE/DE]; Auf dem Mühlberg 75, D-60599 Frankfurt (DE). SCHULTE, Michael [DE/DE]; Im Großen Ramsee 20, D-65428 Rüsselsheim (DE). KÖNIG, Burkhard [DE/DE]; Altwiekring 18, D-38102 Braunschweig (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Postfach, D-64271 Darmstadt (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: HETEROAROMATIC OLIGOAMIDES AS AFFINITY LIGANDS

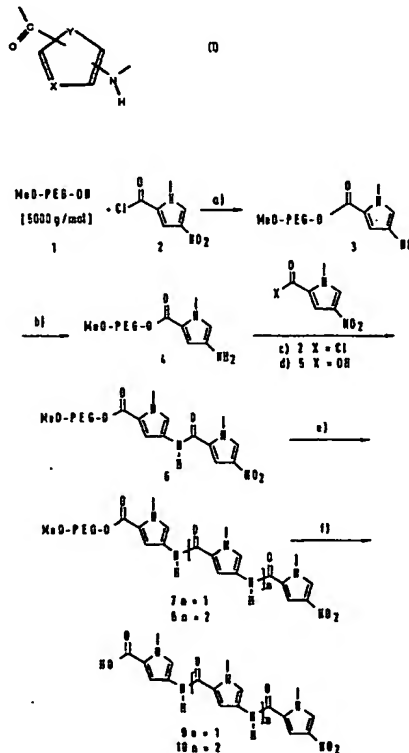
(54) Bezeichnung: HETEROAROMATISCHE OLIGOAMIDE ALS AFFINITÄTSLIGANDEN

(57) Abstract

The invention relates to chromatographic separating media for the separation of nucleic acids, comprising a base carrier and an affinity ligand, which ligand contains a heteroaromatic rest of the formula (I), where X is -CH= or -N= and Y is -NCH₃- or -O-. The invention also relates to a synthesis pathway for producing heteroaromatic oligoamides, in which the heteroaromatic amide units are introduced into a polymer support in the form of nitrated heteroaromatic carboxylic acid derivatives without the need for protective groups.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft chromatographische Trennmaterien für die Trennung von Nukleinsäuren umfassend einen Basisträger und einen Affinitätsliganden, wobei der Affinitätsligand einen heteroaromatischen Rest der Formel (I) enthält, worin X - CH= oder -N= und Y - NCH₃- oder -O- bedeuten. Weiterhin wird ein Syntheseweg für die Herstellung von heteroaromatischen Oligoamiden offenbart, bei dem an einem polymeren Träger die heteroaromatischen Amideinheiten als nitrierte heteroaromatische Carbonsäurederivate eingeführt werden, ohne daß Schutzgruppen vonnöten wären.



BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Heteroaromatische Oligoamide als Affinitätsliganden

Die Erfindung betrifft die Verwendung von heteroaromatischen Oligo-
amiden als Affinitätsliganden in der Chromatographie, sowie besonders
5 bevorzugte Verfahren zur Herstellung von heteroaromatischen Oligo-
amiden.

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten und für die Abreicherung von
DNA aus biologischen Präparaten stehen bisher nur wenige Affinitäts-
10 liganden zur Verfügung. Es wurde gefunden, daß heteroaromatische
Oligoamide als Affinitätsliganden für die affinitätschromatographische
Trennung von DNA geeignet sind.

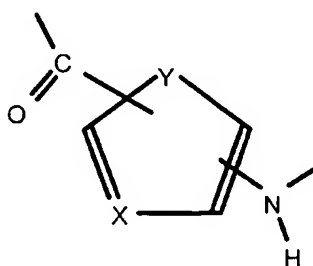
Heteroaromatische Oligoamide gehören zu den Verbindungsklassen, die
15 an DNA binden (D.S. Johnson und D.L. Boger (1996) in Comprehensive
Supramolecular Chemistry; Pergamon). Weitere Anwendungsmöglich-
keiten dieser Verbindungsklasse sind ebenfalls bekannt; dazu gehören die
Verwendung als Modellsubstanzen bei der sequenzspezifischen DNA-
Erkennung, Verwendung als Regulationsfaktoren in der Molekularbiologie
20 oder als genspezifische Pharmaka. Heteroaromatische Oligoamide sind
durch Peptidbindungen zwischen Aminocarbonsäuren, die einen hetero-
aromatischen Kern aufweisen, gekennzeichnet. Synthesen für diese Ver-
bindungsklasse sind ebenfalls bekannt. Jedoch sind bisher beschriebene
Synthesewege, wie z.B. der von E.E. Baird und P.B. Dervan (1996) in J.
25 Am. Chem. Soc. 118, Seiten 6141 - 6146, beschriebene, wegen der
zusätzlichen Schutzgruppenchemie äußerst aufwendig. Für die Bereit-
stellung eines Affinitätsliganden sollten jedoch möglichst einfache
Synthesewege zur Verfügung stehen.

30 Es besteht also die Aufgabe, Trennmaterialien für die Affinitätschromato-
graphie von Nukleinsäuren bereitzustellen. Um diese Aufgabe möglichst
wirtschaftlich zu lösen, besteht insbesondere die zusätzliche Aufgabe, ein-

fache Synthesewege ohne Schutzgruppenchemie für heteroaromatische Oligoamide bereitzustellen.

Es wurde gefunden, daß ausgehend von nitrierten heteroaromatischen Carbonsäurederivaten heteroaromatische Oligoamide mittels Festphasen-synthese synthetisiert werden können, ohne daß Schutzgruppen eingeführt werden müssen. Somit können bekannte oder auch neue heteroaromatische Oligoamide in einfacher Weise bereitgestellt werden; diese auf verbesserten Synthesewegen zugänglichen Verbindungen stehen insbesondere auch als Affinitätsliganden zur Verfügung.

Gegenstand der Erfindung sind chromatographische Trennmaterialien für die Trennung von Nukleinsäuren umfassend einen Basisträger und einen Affinitätsliganden, wobei der Affinitätsligand einen heteroaromatischen Rest der Formel I enthält,



worin

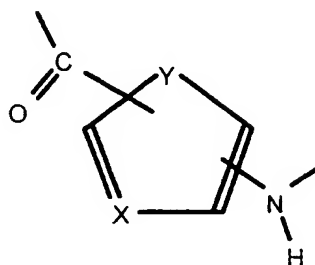
X -CH= oder -N=

und

Y -NCH₃- oder -O-

bedeuten. Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieser Trennmaterialien für die chromatographische Trennung von Nukleinsäuren.

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von hetero-
aromatischen Oligoamiden, die einen heteroaromatischen Rest der Formel
I enthalten,



worin

X -CH= oder -N=

und

Y -NCH₃- oder -O-

bedeuten, wobei folgende Verfahrensschritte ausgeführt werden:

- a) Bindung einer heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an einen polymeren Träger, wobei die erzeugte Bindung unter Bedingungen gespalten werden kann, bei denen Amidbindungen intakt bleiben;
- b) Reduktion der Nitrogruppe der an den polymeren Träger gebundenen heteroaromatischen Nitrocarbonsäure zu einer Aminogruppe;
- c) Bindung einer weiteren heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an die in Schritt b) entstandenen Aminogruppe, wobei dieselbe heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit wie im Schritt a) oder eine heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit mit anderer Struktur eingeführt wird;
- d) Wiederholung der Schritte b) und c) bis die gewünschte Kettenlänge und Sequenz erzielt ist;
- e) optionale Derivatisierung der zuletzt eingeführten Nitro- oder Amino-

- f) Ablösung des heteroaromatischen Oligoamids vom polymeren Träger;
- g) optionale Umsetzung der in Schritt f) entstandenen Carboxylgruppe.

5 Abbildung 1 zeigt beispielhaft das erfindungsgemäße Syntheschema.
Einzelheiten finden sich in den Beispielen. Die Abbildungen 2 und 3
zeigen einige Beispiele für heteroaromatische Oligoamide, wie sie durch
das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden können. Abbildung 4
zeigt, wie die Kettenverlängerung durch ^1H -NMR-Messung verfolgt werden
10 kann.

Peptidsynthesen an Festphasen sind unter der Bezeichnung Merrifield-
Synthese bekannt. Als Träger dient dabei ein unlösliches Harz. Dieses
Verfahren wird in vielen Varianten verwendet, beispielsweise werden
15 unterschiedliche Trägermaterialien oder Di- oder Tripeptide anstelle von
einzelnen Aminosäuren benutzt. Eine weitere Variante dieser Synthese,
bei der ein gelöstes Polymer (z.B. Polyethylenglykol) als Träger dient,
wurde von M. Mutter et al. (1971) Angew.Chem 83, Seite 883 - 884
beschrieben.

20 Es wurde gefunden, daß unter Verwendung von polymeren Trägern auf der
Grundlage von nitrierten heteroaromatischen Carbonsäurederivaten
heteroaromatische Oligoamide in einfacher Weise zugänglich sind. Dabei
können in die Oligoamidkette auch Monomereinheiten aus abweichenden
25 Verbindungsklassen wie aliphatische oder aromatischen Aminocarbon-
säuren oder wie Sulfonamid- oder Harnstoffderivate eingefügt sein;
Beispiele sind unter den Ziffern 2-12, 2-13 und 2-14 in Abbildung 2, sowie
unter den Ziffern 3-13 und 3-15 in Abbildung 3 gegeben. Unter den
erfindungsgemäßen Begriff heteroaromatische Polyamide fallen somit auch
30 Verbindungen, die teilweise auch Untereinheiten enthalten, die einen
aromatischen Kern aufweisen, und/oder deren Peptidbindung sich von
einer Sulfonsäureamid- oder einer Harnstoffgruppierung ableitet, wobei der

Anteil dieser abweichenden Strukturelemente nicht mehr als die Hälfte der Anzahl der Monomereinheiten beziehungsweise Strukturelemente betrifft.

5 Als polymere Träger können sowohl unlösliche Polymerisate, z.B. vernetzte DIOL- oder epoxidmodifizierte Poly(met)acrylate oder derivatisierte anorga-
nische Materialien, wie z.B. DIOL- oder epoxidmodifiziertes Kieselgel, oder
auch lösliche Polymerisate, wie z.B. Polyethylenglykolderivate, verwendet
werden. Alle diese Varianten werden erfindungsgemäß als Festphasen-
synthesen an polymeren Trägern zusammengefaßt. In einer ersten Stufe
10 wird als erste Monomereinheit die erste nitrierte heteroaromatische
Carbonsäureeinheit (kurz: Nitrocarbonsäureeinheit) an den Träger
gebunden. Diese Bindung kann direkt oder über einen spacer erfolgen;
die Verwendung von spacern ist von D.J. Gravert und K.D. Janda (1997)
beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, Seiten 6419 - 6423). Als
15 spacer können beispielsweise α - ω -Diamine, wie z.B. Ethylendiamin oder
1,6-Diaminohexan, sowie ω -Aminocarbonsäuren oder ω -Hydroxycarbon-
säuren verwendet werden. Als polymerer Träger wird insbesondere
Methoxypolyethylenglykol, insbesondere mit einem Molekulargewicht von
 10^3 bis 10^4 bevorzugt.

20 Für die Bindung der ersten Monomereinheit stehen dem Fachmann
bekannte Reaktionsketten zur Verfügung: So kann ein Säurechlorid einer
nitrierten heteroaromatischen Carbonsäure mit einer aliphatischen
Hydroxylgruppe auf dem polymeren Träger zur Reaktion gebracht werden.
25 Außerdem ist es beispielsweise möglich, eine nitrierte heteroaromatische
Carbonsäure durch Reaktion mit wasserabspaltenden Agentien, wie z.B.
Dicyclohexylcarbodiimid, oder durch die Aktivierung der Hydroxylgruppe
oder der Carboxylgruppe an den polymeren Träger zu binden. Geeignete
Reaktionen und die notwendigen Reaktionsbedingungen sind beispiels-
30 weise aus der Peptidchemie bekannt und in gängigen Handbüchern dieses
Fachgebietes beschrieben.

Im folgenden Reaktionsschritt wird die Nitrogruppe zu einer Aminogruppe reduziert. Geeignete Reduktionsmethoden sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt wird die katalytische Reduktion mit Ammoniumformiat in Gegenwart von Palladium ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{Pd/C}$ in CH_2Cl_2 :Methanol). Nach Abtrennung des Katalysators durch Filtration kann das polymergebundene Amin durch Zugabe von Ether ausgefällt werden und in CH_2Cl_2 gelöst werden, wobei überschüssiges NH_4HCO_2 im Rückstand verbleibt.

Anschließend kann die nächste Monomereinheit eingefügt werden, wobei für die Bildung der Peptidbindung die oben bereits genannten Vorgehensweisen zur Verfügung stehen. Die Nitrogruppe der neu eingefügten Monomereinheit wird wiederum wie bereits im vorgehenden beschrieben zur Aminogruppe reduziert. Diese Reaktionsfolgen können wiederholt werden, bis das Reaktionsprodukt die gewünschte Länge aufweist. Durch Auswahl der Monomereinheiten kann die gewünschte Sequenz erzielt werden. Dabei können neben verschiedenen nitrierten heterocyclischen Carbonsäuren auch aromatische Nitrosulfonylchloride oder Nitroisocyanate oder andere Aminocarbonsäuren eingesetzt werden, wobei die oben genannten Sequenzvariationen erzeugt werden. Die Kettenverlängerung durch den Einbau der Monomereinheiten kann durch NMR-Messung verfolgt werden.

Die Nitrogruppe der letzten Monomereinheit kann nach bekannten Verfahren weiter umgesetzt werden; es ist ebenfalls möglich als Monomereinheit eine Carbonsäure ohne Nitrogruppe zu verwenden.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren benötigten nitrierten (hetero)-aromatischen Carbonsäuren und deren Derivate sind kommerziell erhältlich oder nach Standardmethoden der organischen Synthese zugänglich.

Falls gewünscht, kann das erzeugte heteroaromatische Oligoamid vom polymeren Träger nach bekannten Methoden, z.B. hydrolytisch, abgespal-

- ten werden. Anschließend kann das freigesetzte heteroaromatische Oligoamid gegebenenfalls weiter umgesetzt werden, z.B. indem man eine spacer-Gruppierung einführt, oder indem man das heteroaromatische Oligoamid direkt an einen chromatographischen Basisträger bindet. Falls
5 der polymere Träger als Basisträger für die Chromatographie geeignet ist, kann das heteroaromatische Oligoamid auch auf dem polymeren Träger verbleiben und das Produkt direkt als chromatographisches Trennmaterial Verwendung finden.
- 10 Unter dem Begriff Basisträger für die Chromatographie werden Materialien verstanden, auf deren Grundlage chromatographische Trennmaterialien bereitgestellt werden können; dazu gehören beispielsweise: vernetzte organische Polymere, wie Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisate oder wie Copolymerisate auf der Grundlage von Poly(meth)acrylaten, Polysaccharide und deren Derivate, Kieselgele und deren Derivate. Basisträger
15 können sowohl porös mit in der Chromatographie üblichen Porenweiten als auch unporös vorliegen. Basisträger können außerdem in partikulärer Form mit in der Chromatographie üblichen Abmessungen, aber auch in nicht-partikulärer Form beispielsweise als säulenförmige Formkörper oder
20 als Membranen, vorliegen. Derartige Materialien sind dem Fachmann bekannt und deren Eigenschaften und Verwendung in Handbüchern beschrieben. Viele geeignete Materialien sind zudem kommerziell erhältlich. Die chromatographischen Trennmaterialien entsprechend der vorliegenden Erfindung werden für die Affinitätschromatographie eingesetzt
25 und enthalten deswegen heteroaromatische Oligoamide als Affinitätsliganden, die für die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und dem chromatographischen Trennmaterial verantwortlich sind.

In Abbildung 1 ist eine Reaktionsfolge in zwei Varianten beispielhaft
30 dargestellt: Methoxypolyethylenglycol (MeO-PEG-OH) mit einem mittleren Molekulargewicht von 5000 diente als polymerer Träger. Durch Umsetzung mit 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid (1) mit MeO-

PEG-OH unter Standardbedingungen wird die erste heterocyclische Monomereinheit in Esterbindung eingeführt (Reaktionsschritt a)). Die Bindungskapazität des polymeren Trägers beträgt für die erste heterocyclische Monomereinheit ca. 2,5 g/100 g Träger. Anschließend wird die Nitrogruppe mit $\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{Pd/C}$ in CH_2Cl_2 :Methanol (1:8; v:v) bei Raumtemperatur innerhalb einer Stunde zur Aminogruppe reduziert (Reaktionsschritt b)). Der feste Katalysator wird abfiltriert. Das an den polymeren Träger gebundene Amin wird anschließend mit Diethylether ausgefällt. Anschließend wird das an den polymeren Träger gebundene Amin mit CH_2Cl_2 gelöst und kann für den nächsten Kopplungsschritt verwendet werden; überschüssiges NH_4HCO_2 bleibt zurück. Für den nächsten Kopplungsschritt kann das Säurechlorid (2) in Gegenwart von Pyridin zur Reaktion gebracht werden (Reaktionsschritt c)). Es ist an dieser Stelle auch möglich, statt des Säurechlorides (2) die freie Säure (5) einzusetzen und diese mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC/HOBt) an die Aminogruppe zu binden (Reaktionsschritt d)). Durch die Wiederholung des Reduktions- und des Kopplungsschrittes werden Trimere und Tetramere erhalten (Reaktionsschritt e)). Nachdem gewünschte Sequenz und Kettenlänge erreicht sind, wird das heteroaromatische Oligoamid durch Alkalibehandlung hydrolytisch vom polymeren Träger abgespalten (Reaktionsschritt f)).

In den Abbildungen 2 und 3 sind beispielhaft einige weitere heteroaromatische Oligoamide dargestellt, wie sie durch das erfindungsgemäße Verfahren auf einfache Weise zugänglich sind. In den Abbildungen 2 und 3 bedeuten:

R MeO-PEG-O- oder HO-
X -CH= oder -N=
n 1, 2 oder 3

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung in weitesten Umfang nutzen kann. Die

bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeine Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

- 5 Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, sowie der korrespondierenden Anmeldung DE 198 05 431.9, eingereicht am 1.02.1998, sind durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

10

Beispiele

Im folgenden bedeutet Raumtemperatur eine Temperatur zwischen 15 und 30 °C. Die im folgenden in den Beispielen 1 und 2 benutzten Verweis-
15 zeichen beziehen sich auf Abbildung 1.

Beispiel 1: Bindung des ersten Monomerbausteines an Polyethylenglykol

- 20 Erste Stufe (Kopplungsreaktion): 10 g Methoxypolyethylenglykol (MeO-PEG-OH) mit einem mittleren Molekulargewicht von 5000 werden in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst. Unter Rühren werden 1,2 g 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid (1) und 2 ml trockenes Pyridin zugefügt und die Mischung weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die
25 Reaktionslösung filtriert und das polymergebundene Produkt durch Zugabe von 800 ml Diethylether ausgefällt und abgefiltert. Das Produkt wird zweimal umgefällt und im Vakuum getrocknet, es kann mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden.
- 30 Die Ausbeute ist quantitativ. 100 g MeO-PEG-OH binden ca. 2,5 g 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid.

Zweite Stufe (Reduktion): 5 g des Produktes (3) aus Stufe 1 werden mit 200 mg Pd/C (10 %) und 1 g Ammoniumformiat in 50 ml CH_2Cl_2 / Methanol (1:8; v:v) gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und das Produkt durch Zugabe von 400 ml Diethylether ausgefällt und abfiltriert. Der erhaltene weiße Rückstand wird mit 25 ml CH_2Cl_2 behandelt, wobei das polymergebundene Produkt in Lösung geht und unverbrauchtes Ammoniumformiat zurückbleibt. Der Rückstand wird abfiltriert; die Lösung des polymergebundenen Produktes (4) kann unmittelbar für die Kopplung der nächsten Monomereinheit verwendet werden.

Beispiel 2: Einführung von weiteren Monomerbausteinen

Stufe 1 (Kopplung): Die Lösung aus der zweiten Stufe von Beispiel 1 wird unter Rühren mit 570 mg 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid (1) und 1 ml trockenem Pyridin versetzt und die Mischung weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung filtriert und das polymergebundene Produkt (6) durch Zugabe von 400 ml Diethylether ausgefällt und abgefiltert. Das Produkt wird zweimal umgefällt und im Vakuum getrocknet, es kann mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden. Die Ausbeute ist quantitativ.

Zweite Stufe (Reduktion): 5 g des Produktes (6) aus Stufe 1 werden mit 200 mg Pd/C (10 %) und 1 g Ammoniumformiat in 50 ml CH₂Cl₂ / Methanol (1:8; v:v) gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und das Produkt durch Zugabe von 400 ml Diethylether ausgefällt und abfiltriert. Der erhaltene weiße Rückstand wird mit 25 ml CH₂Cl₂ behandelt, wobei das polymergebundene Produkt in Lösung geht und unverbrauchtes Ammoniumformiat zurückbleibt. Der Rückstand wird abfiltriert; die Lösung des polymergebundenen Produktes kann unmittelbar für die Kopplung der nächsten Monomereinheit verwendet werden.

Der Zyklus aus Kopplungsreaktion und Reduktion kann mehrfach wiederholt werden.

15

Beispiel 3: Abspaltung des heteroaromatischen Oligoamids vom polymeren Träger

Sobald das Oligomere ((7); (8)) die gewünschte Kettenlänge erreicht hat, wird es durch Behandlung mit 2 N NaOH bei 50 °C (Dauer 6 Stunden) hydrolytisch vom polymeren Träger abgespalten (Reaktion f)). Es entsteht die freie Carbonsäure des heteroaromatischen Oligoamids ((9); (10)). Die Ausbeute ist quantitativ.

20

Beispiel 4: Weitere Umsetzungen an einem heteroaromatischen Oligoamid

In einem nach den vorhergehenden Beispielen erhaltenen polymergebundenen heteroaromatischen Oligoamid wird die Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert und anschließend mit Glycin umgesetzt. Nach der hydrolytischen Abspaltung vom polymeren Träger wird die Carboxylgruppe mit N,N-Dimethylpropylendiamin umgesetzt. Beispielhafte Reaktionsprodukte sind in Abbildung 3, Formel 3-15, dargestellt.

25

30

In Abbildung 3, Formel 3-15, bedeuten:

n 1, 2 oder 3;

X -CH= oder -N=.

5

**Beispiel 5: Bindung eines heteroaromatischen Oligoamids an einen
azlacton-aktivierten Träger**

2 g eines azlactonaktivierten Trägers (Fractogel® Azlacton; Art. Nr. 10 087;
10 Merck KGaA) werden in einer Lösung von 150 mM NaCl in 40 ml
Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und 100 mg eines nach Beispiel 4
erhaltenen derivatisierten heteroaromatischen Oligoamides ($n=1$; $X=-CH=$)
unter Rühren zugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt.
Das erhaltene Produkt wird abfiltriert. Überschüssige Azlactongruppen
15 werden durch Reaktion mit 0,2 M Glycin in Tris-Puffer (pH 8,0) bei 40 °C (2
Stunden) inaktiviert. Das Produkt wird abgesaugt und mit Phosphatpuffer
pH 7 gewaschen.

20 Es resultiert ein chromatographisches Trennmaterial, das als Separations-
effektor ein derivatisiertes heteroaromatisches Oligoamid enthält.

**Beispiel 6: Bindung eines heteroaromatischen Oligoamids an einen
epoxy-aktivierten Träger**

25 2 g eines epoxyaktivierten Trägers (Fractogel® Epoxy; Art. Nr. 16 279;
Merck KGaA) werden in einer Lösung von 150 mM NaCl in 40 ml
Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und 100 mg eines nach Beispiel 4
erhaltenen derivatisierten heteroaromatischen Oligoamides ($n=1$; $X=-CH=$)
unter Rühren zugefügt und 72 Stunden bei 40 °C weiter gerührt. Das
30 erhaltene Produkt wird abfiltriert. Überschüssige Epoxygruppen werden
durch Reaktion mit 0,2 M Glycin in Tris-Puffer (pH 8,0) bei 40 °C (2

Stunden) inaktiviert. Das Produkt wird abgesaugt und mit Carbonatpuffer pH 10 gewaschen.

5 Es resultiert ein chromatographisches Trennmaterial, das als Separations-effektor ein derivatisiertes heteroaromatisches Oligoamid enthält.

10

15

20

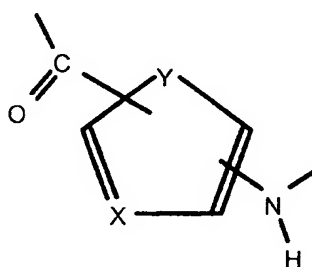
25

30

Ansprüche

1. Chromatographisches Trennmateriel für die Trennung von Nukleinsäuren umfassend einen Basisträger und einen Affinitätsliganden, dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätsligand einen heteroaromatischen Rest der Formel I in Amidbindung enthält,

10



15

worin

X -CH= oder -N=

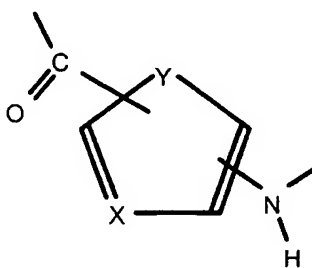
und

Y -NCH₃- oder -O-
bedeuten.

20

2. Verfahren zur Herstellung von heteroaromatischen Oligoamiden, die einen heteroaromatischen Rest der Formel I in Amidbindung enthalten,

25



30

worin

X -CH= oder -N=

und

Y -NCH₃- oder -O-

5 bedeuten, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- a) Bindung einer heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an einen polymeren Träger, wobei die erzeugte Bindung unter Bedingungen gespalten werden kann, bei denen Amidbindungen intakt bleiben;
- 10 b) Reduktion der Nitrogruppe der an den polymeren Träger gebundenen heteroaromatischen Nitrocarbonsäure zu einer Aminogruppe;
- c) Bindung einer weiteren heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an die in Schritt b) entstandenen Aminogruppe, wobei dieselbe heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit wie im Schritt a) oder eine heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit mit anderer Struktur
- 15 eingeführt wird;
- d) Wiederholung der Schritte b) und c) bis die gewünschte Kettenlänge und Sequenz erzielt ist;
- e) optionale Derivatisierung der zuletzt eingeführten Nitro- oder Amino-
- 20 gruppe;
- f) Ablösung des heteroaromatischen Oligoamids vom polymeren Träger;
- g) optionale Umsetzung der in Schritt f) entstandenen Carboxylgruppe.

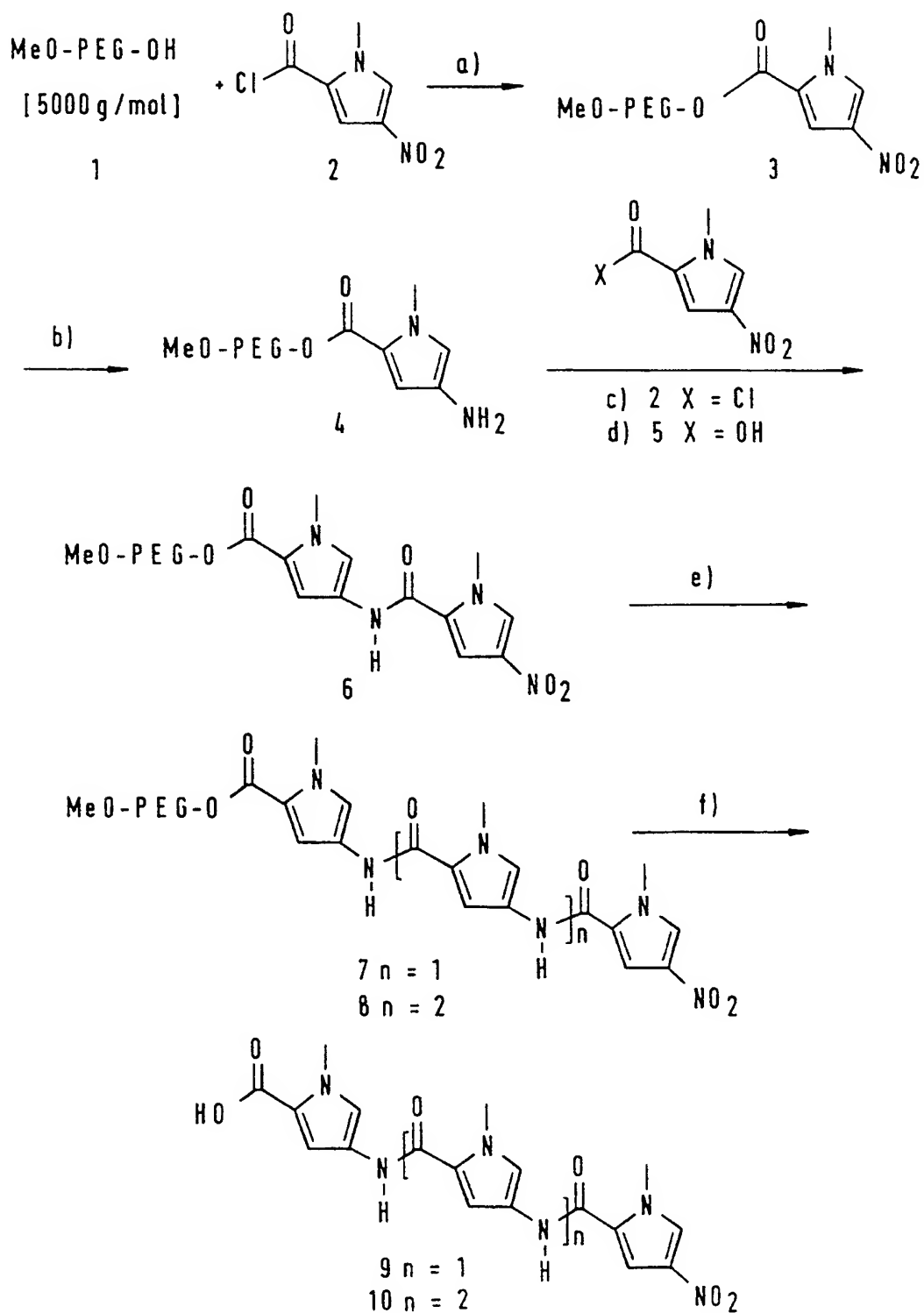
3. Verwendung eines chromatographischen Trennmaterials nach Anspruch 1 für die Trennung von Nukleinsäuren.

25

30

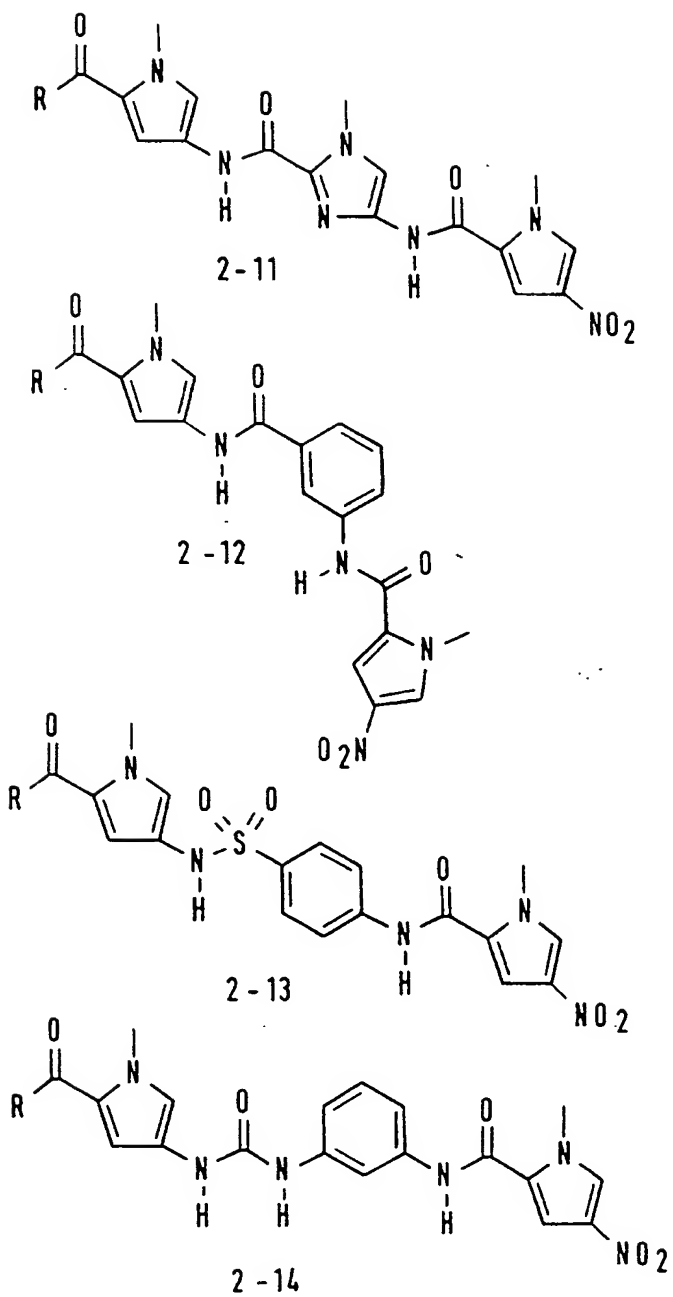
1/4

Fig.1



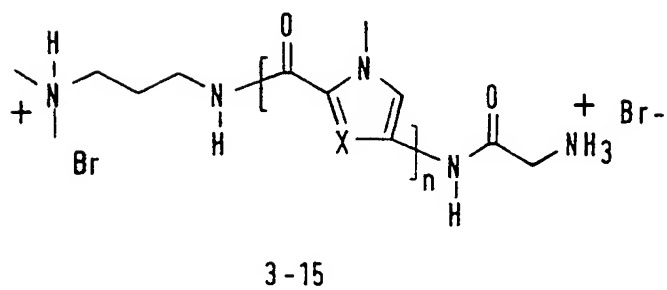
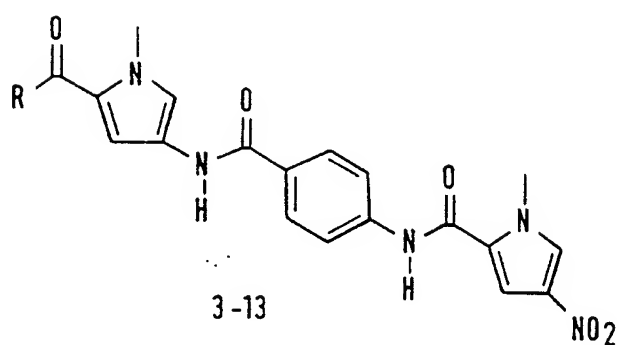
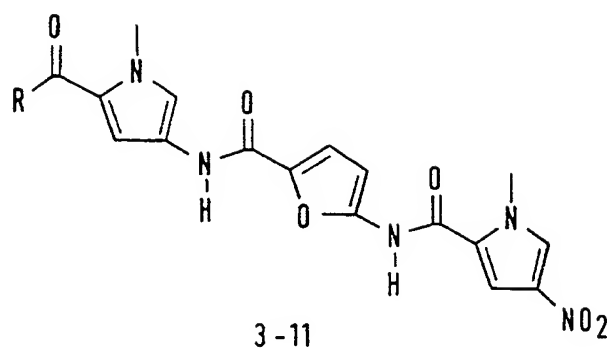
2/4

Fig.2



3/4

Fig.3



4/4

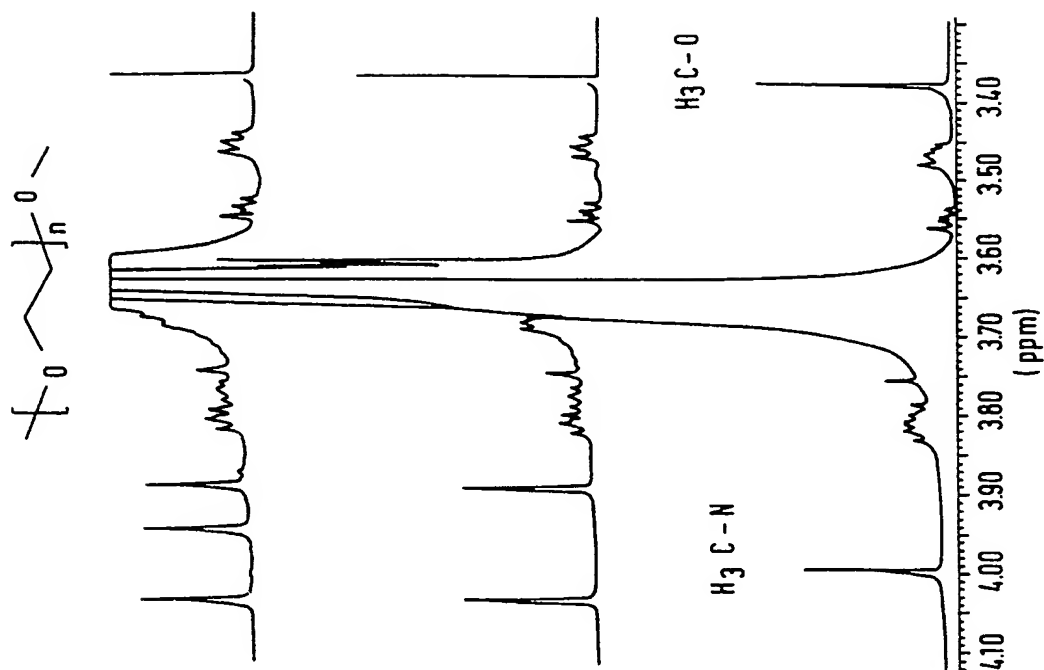
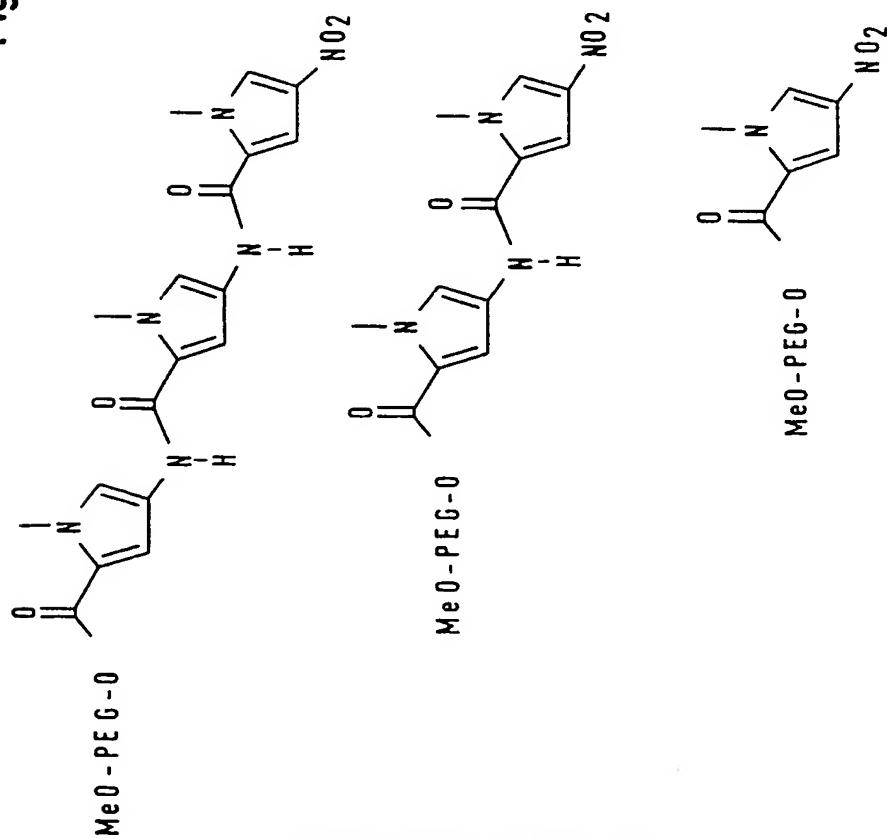


Fig.4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/00580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/10 C07D207/42 C07D207/34 B01D15/08 C07H21/00
C07H1/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07D B01D C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E E BAIRD & P B DERVAN: "Solid phase synthesis of polyamides containing imidazole and pyrrole amino acids" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., vol. 118, no. 26, July 1996, pages 6141-6146, XP000674666 DC US cited in the application see the whole document ----- -/--	2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1999

Date of mailing of the international search report

06/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No

PCT/EP 99/00580

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>F A ARCAMONE ET AL.: "Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 32, no. 4, April 1989, pages 774-778, XP000608784 WASHINGTON US see the whole document ----</p>	2
X	<p>M E PARKS ET AL.: "Optimization of the hairpin polyamide design for recognition of the minor groove of DNA" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., vol. 118, no. 26, July 1996, pages 6147-6152, XP000674668 DC US see the whole document ----</p>	2
X	<p>GB 2 178 037 A (FARMITALIA) 4 February 1987 see the whole document -----</p>	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. nal Application No

PCT/EP 99/00580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2178037 A	04-02-1987	AT 386822 B	25-10-1988
		AT 188786 A	15-03-1988
		AU 584723 B	01-06-1989
		AU 6020386 A	22-01-1987
		BE 905109 A	15-01-1987
		CA 1247627 A	27-12-1988
		CH 671958 A	13-10-1989
		CN 1026984 B	14-12-1994
		CS 8605411 A	16-09-1992
		DE 3623853 A	29-01-1987
		DK 335886 A	17-01-1987
		FI 862960 A,B,	17-01-1987
		FR 2585019 A	23-01-1987
		GR 861840 A	18-11-1986
		IE 59275 B	09-02-1994
		JP 2047860 C	25-04-1996
		JP 7080842 B	30-08-1995
		JP 62030755 A	09-02-1987
		KR 9403495 B	23-04-1994
		NL 8601838 A	16-02-1987
		PH 23459 A	07-08-1989
		PT 82985 A,B	01-08-1986
		SE 468594 B	15-02-1993
		SE 8603099 A	17-01-1987
		SU 1535378 A	07-01-1990
		SU 1538893 A	23-01-1990
		US 4738980 A	19-04-1988

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00580

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/10 C07D207/42 C07D207/34 B01D15/08 C07H21/00
C07H1/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07D B01D C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E E BAIRD & P B DERVAN: "Solid phase synthesis of polyamides containing imidazole and pyrrole amino acids" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., Bd. 118, Nr. 26, Juli 1996, Seiten 6141-6146, XP000674666 DC US in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00580

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>F A ARCAMONE ET AL.: "Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., Bd. 32, Nr. 4, April 1989, Seiten 774-778, XP000608784 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument ----</p>	2
X	<p>M E PARKS ET AL.: "Optimization of the hairpin polyamide design for recognition of the minor groove of DNA" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., Bd. 118, Nr. 26, Juli 1996, Seiten 6147-6152, XP000674668 DC US siehe das ganze Dokument ----</p>	2
X	<p>GB 2 178 037 A (FARMITALIA) 4. Februar 1987 siehe das ganze Dokument -----</p>	2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00580

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2178037 A	04-02-1987	AT 386822 B	25-10-1988
		AT 188786 A	15-03-1988
		AU 584723 B	01-06-1989
		AU 6020386 A	22-01-1987
		BE 905109 A	15-01-1987
		CA 1247627 A	27-12-1988
		CH 671958 A	13-10-1989
		CN 1026984 B	14-12-1994
		CS 8605411 A	16-09-1992
		DE 3623853 A	29-01-1987
		DK 335886 A	17-01-1987
		FI 862960 A,B,	17-01-1987
		FR 2585019 A	23-01-1987
		GR 861840 A	18-11-1986
		IE 59275 B	09-02-1994
		JP 2047860 C	25-04-1996
		JP 7080842 B	30-08-1995
		JP 62030755 A	09-02-1987
		KR 9403495 B	23-04-1994
		NL 8601838 A	16-02-1987
		PH 23459 A	07-08-1989
		PT 82985 A,B	01-08-1986
		SE 468594 B	15-02-1993
		SE 8603099 A	17-01-1987
		SU 1535378 A	07-01-1990
		SU 1538893 A	23-01-1990
		US 4738980 A	19-04-1988

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)